

8/5/5

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

009565138

WPI Acc No: 1993-258686/199332

XRAM Acc No: C93-114929

New granulocyte colony stimulating factor fusion proteins - contg.
stabilising protein, for treating leukopenia, leukaemia, etc.

Patent Assignee: RHONE-POULENC RORER SA (RHON); RHONE-POULENC RORER SA
(RHON)

Inventor: YEH P

Number of Countries: 022 Number of Patents: 007

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9315211	A1	19930805	WO 93FR86	A	19930128	199332 B
FR 2686900	A1	19930806	FR 921065	A	19920131	199344
FI 9403564	A	19940729	WO 93FR86	A	19930128	199437
			FI 943564	A	19940729	
NO 9402858	A	19940801	WO 93FR86	A	19930128	199438
			NO 942858	A	19940801	
EP 624200	A1	19941117	EP 93904130	A	19930128	199444
			WO 93FR86	A	19930128	
JP 7503844	W	19950427	JP 93512987	A	19930128	199525
			WO 93FR86	A	19930128	
US 5665863	A	19970909	WO 93FR86	A	19930129	199742
			US 94256938	A	19940727	

Priority Applications (No Type Date): FR 921065 A 19920131

Cited Patents: DE 3723781; EP 361991; EP 364980; EP 395918; EP 401384; WO
9013653

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

WO 9315211	A1	F	36	C12N-015/62	
------------	----	---	----	-------------	--

Designated States (National): CA FI JP NO US

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL
PT SE

FR 2686900	A1		26	C12P-021/02	
------------	----	--	----	-------------	--

EP 624200	A1	F		C12N-015/62	Based on patent WO 9315211
-----------	----	---	--	-------------	----------------------------

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL
PT SE

JP 7503844	W			C12N-015/09	Based on patent WO 9315211
------------	---	--	--	-------------	----------------------------

US 5665863	A		32	C12N-015/27	Based on patent WO 9315211
------------	---	--	----	-------------	----------------------------

FI 9403564	A			C12N-000/00	
------------	---	--	--	-------------	--

NO 9402858	A			C12N-000/00	
------------	---	--	--	-------------	--

Abstract (Basic): WO 9315211 A

New recombinant polypeptides (I) comprise an active portion (II) coupled to a protein stabilising structure (III), where (II) comprises all or part of human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) or a G-CSF variant.

Also claimed are: (1) nucleotide sequences coding for (I); (2) expression cassettes contg. such a nucleotide sequence under the control of a transcription initiation region and opt. a transcription termination region; (3) self-replicating plasmids contg. such expression cassettes; and (4) recombinant eukaryotic or prokaryotic cells contg. such sequences, cassettes or plasmids.

Best Available Copy

USE/ADVANTAGE - (I) may be used to treat diseases requiring an increase in granulocyte count and/or activity, esp. leucopenia and certain forms of leukaemia, or to stimulate the immune system during transplantation (e.g. of bone marrow) or after cancer chemotherapy. (I) are capable of maintaining G-CSF activity for long periods in vivo. E.g., a specifically disclosed polypeptide (HSA-G-CSF) has lowerf activity than native G-CSF in vitro but comparable activity in vivo.

Dwg.0/8

Title Terms: NEW; GRANULOCYTE; COLONY; STIMULATING; FACTOR; FUSE; PROTEIN; CONTAIN; STABILISED; PROTEIN; TREAT; LEUKOPENIA; LEUKAEMIA

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-000/00; C12N-015/09; C12N-015/27; C12N-015/62; C12P-021/02

International Patent Class (Additional): A61K-037/02; A61K-038/00; C07K-013/00; C07K-014/53; C12N-001/19; C12N-015/14; C12N-015/81; C12R-001-645

File Segment: CPI



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/62, 1/19, A61K 37/02 C07K 13/00, C12N 15/27, 15/14 // (C12N 1/19, C12R 1:645)	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/15211 (43) Date de publication internationale: 5 août 1993 (05.08.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00086 (22) Date de dépôt international: 28 janvier 1993 (28.01.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/01065 31 janvier 1992 (31.01.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement) : YEH, Patrice [FR/FR]; 11 bis, rue Lacépède, F-75005 Paris (FR). (74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).		(81) Etats désignés: CA, FI, JP, NO, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: NEW POLYPEPTIDES HAVING GRANULOCYTE COLONY STIMULATING ACTIVITY, PREPARATION THEREOF AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAID POLYPEPTIDES (54) Titre: NOUVEAUX POLYPEPTIDES AYANT UNE ACTIVITE DE STIMULATION DES COLONIES DE GRANULOCYTES, LEUR PREPARATION ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT (57) Abstract New polypeptides having human granulocyte colony stimulating activity, preparation thereof and pharmaceutical compositions containing said polypeptides. (57) Abrégé La présente invention concerne de nouveaux polypeptides ayant une activité de stimulation des colonies de granulocytes humains, leur préparation et des compositions pharmaceutiques les contenant.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

NOUVEAUX POLYPEPTIDES AYANT UNE ACTIVITE DE STIMULATION
DES COLONIES DE GRANULOCYTES,
LEUR PREPARATION ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES
LES CONTENANT

5 La présente invention concerne de nouveaux polypeptides ayant une activité de stimulation des colonies de granulocytes humain; leur préparation et des compositions pharmaceutiques les contenant.

 La présente invention concerne en particulier des polypeptides chimères composés d'une partie biologiquement active constituée par tout ou partie du G-CSF
10 ou d'un variant du G-CSF, et d'une structure stabilisatrice essentiellement protéique lui conférant de nouvelles propriétés biologiques.

 Le G-CSF humain est un polypeptide sécrété de 174 acides aminés, ayant un poids moléculaire de 18 kD environ. Il a été isolé initialement à partir d'une lignée cellulaire cancéreuse (EP 169 566), et son gène a été cloné, séquencé, et
15 exprimé dans différents hôtes cellulaires par les techniques du génie génétique (EP 215 126, EP 220 520). Un ARNm codant potentiellement pour une forme du G-CSF ayant 177 acides aminés a par ailleurs été mis en évidence [Nagata S. et al., EMBO J. 5 (1986) 575-581]. Le G-CSF possède la capacité de stimuler la différenciation et la prolifération de cellules progénitrices de la moelle osseuse en granulocytes. A ce
20 titre, il possède la capacité de stimuler les capacités protectrices de l'organisme contre l'infection en favorisant la croissance des polynucléaires neutrophiles et leur différenciation aboutissant à la maturité. Il est ainsi capable d'activer les fonctions prophylactiques de l'organisme, et peut être utilisé dans différentes situations pathologiques dans lesquelles le nombre de neutrophiles est anormalement faible, ou
25 dans lesquelles le système immunitaire doit être renforcé. De telles situations surviennent par exemple à la suite des traitements de chimiothérapie anticancéreuse, lors de greffes, et en particulier de greffes de moelle osseuse, ou lors des leukopénies.

 L'un des inconvénients du G-CSF actuellement disponible réside dans le
30 fait qu'il est dégradé rapidement par l'organisme une fois administré. Ceci est d'autant plus sensible que le G-CSF est généralement utilisé à des doses faibles. De plus, l'utilisation de doses plus importantes n'a pu permettre d'améliorer les capacités

thérapeutiques de cette molécule et peut induire des effets secondaires indésirables. Ces phénomènes d'élimination et de dégradation *in vivo* constituent donc pour l'instant un obstacle à l'exploitation de l'activité biologique du G-CSF en tant qu'agent pharmaceutique.

- 5 La présente invention permet de remédier à ces inconvénients. La présente invention fournit en effet de nouvelles molécules permettant une exploitation optimale sur le plan thérapeutique des propriétés biologiques du G-CSF. La demanderesse a en effet mis en évidence que l'activité optimale du G-CSF se manifestait lorsque le G-CSF était présent à faible dose et pendant un temps
- 10 prolongé. La demanderesse a maintenant réalisé des molécules capables de maintenir dans l'organisme une activité G-CSF pendant un temps suffisamment long. De plus, la demanderesse a montré qu'il est possible d'exprimer dans des hôtes cellulaires à des niveaux élevés des fusions génétiques générant des chimères présentant de nouvelles propriétés pharmacocinétiques et les propriétés biologiques désirables du
- 15 G-CSF. En particulier, les polypeptides hybrides de l'invention conservent leur affinité pour les récepteurs du G-CSF, et sont suffisamment fonctionnels pour conduire à la prolifération et à la différenciation cellulaire. Les molécules de l'invention possèdent par ailleurs une distribution et des propriétés pharmacocinétiques particulièrement avantageuses dans l'organisme et permettent le
- 20 développement thérapeutique de leur activité biologique.

Un objet de la présente invention concerne donc des polypeptides recombinants comportant une partie active constituée par tout ou partie du G-CSF, ou d'un variant du G-CSF, et une structure stabilisatrice essentiellement protéique.

- Au sens de la présente invention, le terme variant du G-CSF désigne toute
- 25 molécule obtenue par modification de la séquence comprise entre les résidus Thr586 et Pro759 de la séquence présentée sur la Figure 1, conservant une activité G-CSF, c'est-à-dire la capacité de stimuler la différenciation des cellules cibles et la formation de colonies de granulocytes. Cette séquence correspond à celle du G-CSF mature décrite par Nagata et al. [EMBO J. 5 (1986) 575-581]. Par modification, on
- 30 doit entendre toute mutation, substitution, délétion, addition ou modification consécutive à une action de nature génétique et/ou chimique. De tels variants peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter l'affinité de la molécule pour le(s) récepteur(s) du G-CSF, celui d'améliorer ses

niveaux de production, celui d'augmenter sa résistance à des protéases, celui d'augmenter son efficacité thérapeutique ou de réduire ses effets secondaires, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés pharmacocinétiques et/ou biologiques.

Des polypeptides de l'invention particulièrement avantageux sont ceux dans
5 lesquels la partie biologiquement active possède :

- (a) la séquence peptidique comprise entre les résidus Thr586 et Pro759 de la séquence présentée sur la Figure 1, ou,
- (b) une partie de la structure (a), ou,
- (c) une structure dérivée des structures (a) ou (b) par modifications
10 structurales (mutation, substitution addition et/ou délétion d'un ou plusieurs résidus) et ayant une activité biologique identique ou modifiée. Ce dernier type de polypeptides comprend par exemple les molécules dans lesquelles certains sites de glycosylation ont été modifiés ou supprimés, ainsi que des molécules dans lesquelles un, plusieurs, voire tous les résidus cystéine ont été substitués. Il comprend
15 également des molécules obtenues à partir de (a) ou (b) par délétion de régions n'intervenant pas ou peu dans l'activité, ou intervenant dans une activité indésirable, et des molécules comportant par rapport à (a) ou (b) des résidus supplémentaires, tels que par exemple une méthionine N-terminale ou un signal de sécrétion.

Plus préférentiellement, les polypeptides chimères de l'invention
20 comprennent une partie active de type (a).

La partie active des molécules de l'invention peut être couplée à la structure stabilisatrice protéique, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un peptide de jonction. De plus, elle peut constituer l'extrémité N-terminale comme l'extrémité C-terminale de la molécule. Préférentiellement, dans les molécules de l'invention, la
25 partie active constitue la partie C-terminale de la chimère.

Comme indiqué plus haut, la structure stabilisatrice des polypeptides de l'invention est essentiellement protéique.

Préférentiellement, cette structure est un polypeptide possédant une demi-vie plasmatique élevée. A titre d'exemple, il peut s'agir d'une albumine, une
30 apolipoprotéine, une immunoglobuline ou encore une transferrine. Il peut également s'agir de peptides dérivés de telles protéines par modifications structurales, ou de peptides synthétisés artificiellement ou semi-artificiellement, et possédant une

demie-vie plasmatique élevée. Par ailleurs, la structure stabilisatrice utilisée est plus préférentiellement un polypeptide faiblement ou non-immunogénique pour l'organisme dans lequel les polypeptides de l'invention sont utilisés.

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, la
5 structure stabilisatrice est une albumine ou un variant de l'albumine et par exemple la sérum-albumine humaine (SAH). Il est entendu que les variants de l'albumine désignent toute protéine à haute demie-vie plasmatique obtenue par modification (mutation, délétion et/ou addition) par les techniques du génie génétique d'un gène codant pour un isomorphe donné de la sérum-albumine humaine, ainsi que toute
10 macromolécule à haute demie-vie plasmatique obtenue par modification *in vitro* de la protéine codée par de tels gènes. L'albumine étant très polymorphe, de nombreux variants naturels ont déjà été identifiés, et plus de 30 types génétiques différents ont été répertoriés [Weitkamp L.R. et al., Ann. Hum. Genet. 37 (1973) 219]. Plus préférentiellement, la structure stabilisatrice est une albumine mature.

15 A titre d'exemples on peut citer des polypeptides de l'invention comportant, dans le sens N-terminal --> C-terminal, (i) la séquence de la SAH mature couplée directement à la séquence du G-CSF mature (cf. Figure 1), ou (ii) la séquence du G-CSF mature couplée par l'intermédiaire d'un peptide de liaison à la séquence de la SAH mature.

20 Un autre objet de l'invention concerne un procédé de préparation des molécules chimères décrites ci-avant. Plus précisément, ce procédé consiste à faire exprimer par un hôte cellulaire eucaryote ou procaryote une séquence nucléotidique codant pour le polypeptide désiré, puis à récolter le polypeptide produit.

Parmi les hôtes eucaryotes utilisables dans le cadre de la présente invention,
25 on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre Saccharomyces, Kluyveromyces, Pichia, Schwanniomyces, ou Hansenula. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, CI27, etc... Parmi les champignons susceptibles d'être utilisés dans la présente invention, on peut citer plus
30 particulièrement Aspergillus ssp. ou Trichoderma ssp. Comme hôtes procaryotes, on préfère utiliser les bactéries telles que Escherichia coli, ou appartenant aux genres Corynebacterium, Bacillus, ou Streptomyces.

Les séquences nucléotidiques utilisables dans le cadre de la présente invention peuvent être préparées de différentes manières. Généralement, elles sont obtenues en assemblant en phase de lecture les séquences codant pour chacune des parties fonctionnelles du polypeptide. Celles-ci peuvent être isolées par les techniques de l'homme de l'art, et par exemple directement à partir des ARN messagers (ARNm) cellulaires, ou par reclonage à partir d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) isolé à partir de cellules productrices, ou encore il peut s'agir de séquences nucléotidiques totalement synthétiques. Il est entendu de plus que les séquences nucléotidiques peuvent également être ultérieurement modifiées, par exemple par les techniques du génie génétique, pour obtenir des dérivés ou des variants desdites séquences.

Plus préférentiellement, dans le procédé de l'invention, la séquence nucléotidique fait partie d'une cassette d'expression comprenant une région d'initiation de la transcription (région promoteur) permettant, dans les cellules hôtes, l'expression de la séquence nucléotidique placée sous son contrôle et codant pour les polypeptides de l'invention. Cette région peut provenir de régions promoteurs de gènes fortement exprimés dans la cellule hôte utilisée, l'expression étant constitutive ou régulable. S'agissant de levures, il peut s'agir du promoteur du gène de la phosphoglycérate kinase (PGK), de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GPD), de la lactase (LAC4), des énoïases (ENO), des alcools deshydrogénases (ADH), etc... S'agissant de bactéries, il peut s'agir du promoteur des gènes droit ou gauche du bactériophage lambda (P_L, P_R), ou encore des promoteurs des gènes des opérons tryptophane (P_{trp}) ou lactose (P_{lac}). En outre, cette région de contrôle peut être modifiée, par exemple par mutagenèse *in vitro*, par introduction d'éléments additionnels de contrôle ou de séquences synthétiques, ou par des délétions ou des substitutions des éléments originels de contrôle. La cassette d'expression peut également comprendre une région de terminaison de la transcription fonctionnelle dans l'hôte envisagé, positionnée immédiatement en aval de la séquence nucléotidique codant pour un polypeptide de l'invention.

Dans un mode préféré, les polypeptides de l'invention résultent de l'expression dans un hôte eucaryote ou procaryote d'une séquence nucléotidique et de la sécrétion du produit d'expression de ladite séquence dans le milieu de culture. Il est en effet particulièrement avantageux de pouvoir obtenir par voie recombinante des molécules directement dans le milieu de culture. Dans ce cas, la séquence

nucléotidique codant pour un polypeptide de l'invention est précédée d'une séquence "leader" (ou séquence signal) dirigeant le polypeptide naissant dans les voies de sécrétion de l'hôte utilisé. Cette séquence "leader" peut être la séquence signal naturelle du G-CSF ou de la structure stabilisatrice dans le cas où celle-ci est une

5 protéine naturellement sécrétée, mais il peut également s'agir de toute autre séquence "leader" fonctionnelle, ou d'une séquence "leader" artificielle. Le choix de l'une ou l'autre de ces séquences est notamment guidé par l'hôte utilisé. Des exemples de séquences signal fonctionnelles incluent celles des gènes des phéromones sexuelles ou des toxines "killer" de levures.

10 En plus de la cassette d'expression, un ou plusieurs marqueurs permettant de sélectionner l'hôte recombiné peuvent être additionnés, tels que par exemple le gène URA3 de la levure S. cerevisiae, ou des gènes conférant la résistance à des antibiotiques comme la généticine (G418) ou à tout autre composé toxique comme certains ions métalliques.

15 L'ensemble constitué par la cassette d'expression et par le marqueur de sélection peut être introduit directement dans les cellules hôtes considérées, soit inséré préalablement dans un vecteur autorépliquatif fonctionnel. Dans le premier cas, des séquences homologues à des régions présentes dans le génôme des cellules hôtes sont préférentiellement additionnées à cet ensemble; lesdites séquences étant alors

20 positionnées de chaque côté de la cassette d'expression et du gène de sélection de façon à augmenter la fréquence d'intégration de l'ensemble dans le génôme de l'hôte en ciblant l'intégration des séquences par recombinaison homologue. Dans le cas où la cassette d'expression est insérée dans un système répliquatif, un système de réplication préféré pour les levures du genre Kluyveromyces est dérivé du plasmide

25 pKD1 initialement isolé de K. drosophilum; un système préféré de réplication pour les levures du genre Saccharomyces est dérivé du plasmide 2μ de S. cerevisiae. De plus, ce plasmide d'expression peut contenir tout ou partie desdits systèmes de réplication, ou peut combiner des éléments dérivés du plasmide pKD1 aussi bien que du plasmide 2μ .

30 En outre, les plasmides d'expression peuvent être des vecteurs navettes entre un hôte bactérien tel que Escherichia coli et la cellule hôte choisie. Dans ce cas, une origine de réplication et un marqueur de sélection fonctionnant dans l'hôte bactérien sont requises. Il est également possible de positionner des sites de

restriction entourant les séquences bactériennes et uniques sur le vecteur d'expression: Ceci permet de supprimer ces séquences par coupure et religature in vitro du vecteur tronqué avant transformation des cellules hôtes, ce qui peut résulter en une augmentation du nombre de copies et en une stabilité accrue des plasmides d'expression dans lesdits hôtes. Par exemple, de tels sites de restriction peuvent correspondre aux séquences telles que 5'-GGCCNNNNNGGCC-3' (SfiI) ou 5'-GCGGCCGC-3' (NotI) dans la mesure où ces sites sont extrêmement rares et généralement absents d'un vecteur d'expression.

Après construction de tels vecteurs ou cassette d'expression, ceux-ci sont introduits dans les cellules hôtes retenues selon les techniques classiques décrites dans la littérature. A cet égard, toute méthode permettant d'introduire un ADN étranger dans une cellule peut être utilisée. Il peut s'agir notamment de transformation, électroporation, conjugaison, ou toute autre technique connue de l'homme de l'art. A titre d'exemple pour les hôtes de type levure, les différentes souches de Kluyveromyces utilisées ont été transformées en traitant les cellules entières en présence d'acétate de lithium et de polyéthylène glycol, selon la technique décrite par Ito et al. [J. Bacteriol. 153 (1983) 163]. La technique de transformation décrite par Durrens et al. [Curr. Genet. 18 (1990) 7] utilisant l'éthylène glycol et le diméthylsulfoxyde a également été utilisée. Il est aussi possible de transformer les levures par électroporation, selon la méthode décrite par Karube et al. [FEBS Letters 182 (1985) 90]. Un protocole alternatif est également décrit en détail dans les exemples qui suivent.

Après sélection des cellules transformées, les cellules exprimant lesdits polypeptides sont inoculées et la récupération desdits polypeptides peut être faite, soit au cours de la croissance cellulaire pour les procédés "en continu", soit en fin de croissance pour les cultures "en lots" ("batch"). Les polypeptides qui font l'objet de la présente invention sont ensuite purifiés à partir du surnageant de culture en vue de leur caractérisation moléculaire, pharmacocinétique et biologique.

Un système d'expression préféré des polypeptides de l'invention consiste en l'utilisation des levures du genre Kluyveromyces comme cellule hôte, transformées par certains vecteurs dérivés du réplicon extrachromosomique pKD1 initialement isolé chez K. marxianus var. drosophilum. Ces levures, et en particulier K. lactis et K. fragilis sont généralement capables de répliquer lesdits vecteurs de façon stable et

possèdent en outre l'avantage d'être incluses dans la liste des organismes G.R.A.S. ("Generally Recognized As Safe"). Des levures privilégiées sont préférentiellement des souches industrielles du genre Kluyveromyces capables de répliquer de façon stable lesdits plasmides dérivés du plasmide pKD1 et dans lesquels a été inséré un

5 marqueur de sélection ainsi qu'une cassette d'expression permettant la sécrétion à des niveaux élevés des polypeptides de l'invention.

La présente invention concerne également les séquences nucléotidiques codant pour les polypeptides chimères décrits ci-avant, ainsi que les cellules recombinantes, eucaryotes ou procaryotes, comprenant de telles séquences.

10 La présente invention concerne aussi l'application à titre de médicament des polypeptides selon la présente invention. Plus particulièrement, l'invention a pour objet toute composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs polypeptides tel que décrit ci-avant. Plus particulièrement, ces compositions peuvent être utilisées dans toutes les situations pathologiques dans lesquelles le nombre et/ou l'activité des

15 granulocytes doivent être stimulées. Notamment, elles peuvent être utilisées pour la prévention ou le traitement des leukopénies ou de certaines leucémies, ou dans le cas de greffes ou de traitement anticancéreux, pour renforcer ou restaurer le système immunitaire.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples

20 qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LISTE DES FIGURES

Les représentations des plasmides indiquées dans les Figures suivantes ne sont pas tracées à l'échelle et seuls les sites de restriction importants pour la compréhension des clonages réalisés ont été indiqués.

25 **Figure 1 :** Séquence nucléotidique du fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1259 (chimère prépro-SAH-G-CSF). Les flèches noires indiquent la fin des régions "pré" et "pro" de la SAH. Les sites de restriction MstII, ApaI et SstI (SacI) sont soulignés. La séquence peptidique du G-CSF est en italique (Thr586->Pro759, la numérotation des acides aminés correspond à la protéine

30 chimère mature).

Figure 2 : Schématisation des chimères du type SAH-G.CSF (A), du type G.CSF-SAH (B) ou G.CSF-SAH-G.CSF (C). Abréviations utilisées : M/LP, méthionine initiatrice de la traduction, éventuellement suivie d'une séquence signal de sécrétion; SAH, sérum-albumine humaine mature ou un de ses variants; G.CSF, peptide dérivé du G-CSF et ayant une activité identique ou modifiée. La flèche noire indique l'extrémité N-terminale de la protéine mature.

Figure 3 : Carte de restriction du plasmide pYG105 et stratégie de construction des plasmides d'expression des protéines chimères de la présente invention. Abréviations utilisées: P, promoteur transcriptionnel; T, terminateur transcriptionnel; IR, séquences répétées inversées du plasmide pKD1; LPSAH, région "prépro" de la SAH; Ap^r et Km^r désignent respectivement les gènes de résistance à l'ampicilline (*E. coli*) et au G418 (levures).

Figure 4 : Caractérisation du matériel sécrété après 4 jours de culture (erlenmeyers) de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1266 (plasmide d'expression d'une chimère du type SAH-G.CSF) et pKan707 (plasmide contrôle). Dans cette expérience les résultats des panneaux A, B, et C ont été migrés sur le même gel (SDS-PAGE 8,5 %) puis traités séparément.

A, coloration au bleu de coomassie; standard de poids moléculaire (piste 2) ; surnageant équivalent à 100 µl de la culture transformée par les plasmides pKan707 en milieu YPL (piste 1), ou pYG1266 en milieu YPD (piste 3) ou YPL (piste 4).

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps primaires dirigés contre le G-CSF humain: même légende qu'en A.

C, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps primaires dirigés contre l'albumine humaine: même légende qu'en A.

Figure 5 : Séquence nucléotidique du fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1301 (chimère G.CSF-Gly4-SAH). Les flèches noires indiquent la fin des régions "pré" et "pro" de la SAH. Les sites de restriction ApaI, SstI (SacI) et MstII sont soulignés. Les domaines G.CSF (174 résidus) et SAH (585 résidus) sont séparés par le linker synthétique GGGG. La numérotation des acides aminés correspond à la protéine chimère G.CSF-Gly4-SAH mature (763 résidus). La séquence nucléotidique comprise entre le codon de terminaison de la traduction et le

site HindIII provient de l'ADN complémentaire (cDNA) de la SAH tel que décrit dans la demande de brevet EP 361 991.

Figure 6 : Caractérisation du matériel sécrété après 4 jours de culture (erlenmeyers en milieu YPD) de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1267 (chimère SAH-G.CSF), pYG1303 (chimère G.CSF-Gly4-SAH) et pYG1352 (chimère SAH-Gly4-G.CSF) après migration sur gel SDS-PAGE 8,5 %.

A, coloration au bleu de coomassie; surnageant équivalent à 100 µl de la culture transformée par les plasmides pYG1303 (piste 1), pYG1267 (piste 2) ou pYG1352 (piste 3); standard de poids moléculaire (piste 4).

B, caractérisation immunologique du matériel sécrété après utilisation d'anticorps primaires dirigés contre le G-CSF humain : même légende qu'en A.

Figure 7 : Activité sur la prolifération cellulaire in vitro de la lignée murine NFS60. La radioactivité (³H-thymidine) incorporée dans les noyaux cellulaires après 6 heures d'incubation est représentée en ordonnée (cpm) ; la quantité de produit indiquée en abscisse est exprimée en molarité (unités arbitraires).

Figure 8 : Activité sur la granulopoïèse in vivo chez le rat. Le nombre de neutrophiles (moyenne de 7 animaux) est indiquée en ordonnée en fonction du temps. Les produits testés sont la chimère SAH-G.CSF (pYG1266, 4 ou 40 mg/rat/jour), le G-CSF référence (10 mg/rat/jour), la SAH recombinante purifiée à partir de surnageant de Kluyveromyces lactis (rHSA, 30 mg/rat/jour, cf. EP 361 991), ou du sérum physiologique.

EXEMPLES

TECHNIQUES GENERALES DE CLONAGE

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans Escherichia coli

etc... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982 ; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les enzymes de restriction ont été fournies par New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Amersham et sont utilisées selon les recommandations des fournisseurs.

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes est effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'E.coli (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques est effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] est effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques est effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Les transformations de K. lactis avec l'ADN des plasmides d'expression des protéines de la présente invention sont effectuées par toute technique connue de l'homme de l'art, et dont un exemple est donné dans le texte.

Sauf indication contraire, les souches bactériennes utilisées sont *E. coli* MC1060 (*lac*⁺ *IPZYA*, *X74*, *galU*, *galK*, *strA*^r), ou *E. coli* TG1 (*lac*, *proA*, *B*, *supE*, *thi*, *hsdD5* / *F*⁺ *traD36*, *proA*⁺ *B*⁺, *lacI*^q, *lacZ*, M15).

Les souches de levures utilisées appartiennent aux levures bourgeonnantes et plus particulièrement aux levures du genre *Kluyveromyces*. Les souche *K. lactis* MW98-8C (a, *uraA*, *arg*, *lys*, *K*⁺, *pKD1*^o) et *K. lactis* CBS 293.91 ont été particulièrement utilisées ; un échantillon de la souche MW98-8C a été déposé le 16 Septembre 1988 au Centraalbureau voor Schimmelkulturen (CBS) à Baarn (Pays-Bas) où il a été enregistré sous le numéro CBS 579.88.

Les souches de levures transformées par les plasmides d'expression codant pour les protéines de la présente invention sont cultivées en erlenmeyers ou en fermenteurs pilotes de 2l (SETRIC, France) à 28°C en milieu riche (YPD : 1 % yeast extract, 2 % Bactopeptone, 2 % glucose ; ou YPL : 1 % yeast extract, 2 % Bactopeptone, 2 % lactose) sous agitation constante.

EXEMPLE 1 : CONSTRUCTION D'UN FRAGMENT DE RESTRICTION *Mst*II/*Hind*III INCLUANT LA PARTIE MATURE DU G-CSF HUMAIN

Un fragment de restriction *Mst*II-*Hind*III incluant la forme mature du G-CSF humain est généré, par exemple selon la stratégie suivante : un fragment de restriction *Kpn*I-*Hind*III est d'abord obtenu par la technique d'amplification enzymatique PCR en utilisant les oligodéoxynucléotides Sq2291 (5'-CAAGGATCCAAGCTTCAGGGCTGCGCAAGGTGGCGTAG-3', le site *Hind*III est souligné) et Sq2292 (5'-CGGGGTACCTTAGGCTTAACCCCCCTGGGCCCTGCCAGC-3', le site *Kpn*I est souligné) comme amorce sur le plasmide BBG13 servant comme matrice. Le plasmide BBG13 comporte le gène codant pour la forme B (174 acides aminés) du G-CSF mature humain, obtenu auprès de British Bio-technology Limited, Oxford, England. Le produit d'amplification enzymatique d'environ 550 nucléotides est ensuite digéré par les enzymes de restriction *Kpn*I et *Hind*III et cloné dans le vecteur pUC19 coupé par les mêmes enzymes, ce qui génère le plasmide recombinant pYG1255. Ce plasmide est la source d'un fragment de restriction *Mst*II-*Hind*III, dont la séquence est incluse dans celle de la Figure 1. Un fragment de restriction *Mst*II-*Hind*III codant pour la même séquence polypeptidique peut également être généré par la technique d'amplification PCR à partir des cDNA correspondants, dont la séquence est connue [Nagata S. et al., EMBO J. 5 (1986)

575-581]. Ces cDNA peuvent être isolés par les techniques de l'homme de l'art, par exemple en utilisant le kit distribué par Amersham, à partir d'une lignée cellulaire humaine exprimant le G-CSF, et par exemple la lignée cellulaire CHU-2 de carcinome humain [Nagata et al., Nature 319 (1986) 415-418].

5 Il peut être également souhaitable d'insérer un linker peptidique entre la partie SAH et G-CSF, par exemple pour permettre une meilleure présentation fonctionnelle de la partie transductrice. Un fragment de restriction MstII-HindIII est par exemple généré par substitution du fragment MstII-ApaI de la Figure 1 par les oligodéoxynucléotides Sq2742 (5'-TTAGGCTTAGGTGGTGGCGGTACCCCCC-
10 TGGGCC-3', les codons codant pour les résidus glycine de ce linker particulier sont soulignés) et Sq2741 (5'-CAGGGGGGTACCGCCACCACCTAAGCC-3') qui forment en s'appariant un fragment MstII-ApaI. Le plasmide pYG1336 ainsi généré comporte donc un fragment de restriction MstII-HindIII, dont la séquence est identique à celle de la Figure 1 à l'exception du fragment MstII-ApaI.

15 EXEMPLE 2 : FUSIONS EN PHASE TRADUCTIONNELLE ENTRE LA SAH ET LE G-CSF HUMAIN

E.2.1. Fusion traductionnelle du type SAH-G-CSF.

Le plasmide pYG404 est décrit dans la demande de brevet EP 361 991. Ce plasmide comporte un fragment de restriction HindIII codant pour le gène de la
20 prépro-SAH précédé des 21 nucléotides naturellement présents immédiatement en amont de l'ATG initiateur de traduction du gène PGK de S. cerevisiae. Plus particulièrement, ce fragment comporte un fragment de restriction HindIII-MstII correspondant à la totalité du gène codant pour la prépro-SAH à l'exception des trois acides aminés les plus C-terminaux (résidus leucine-glycine-leucine). La ligature de
25 ce fragment avec le fragment MstII-HindIII du plasmide pYG1255 permet de générer le fragment HindIII du plasmide pYG1259 qui code pour une protéine chimère dans laquelle la forme B du G-CSF mature est positionnée par couplage génétique en phase traductionnelle en C-terminal de la molécule de SAH. La séquence nucléotidique de ce fragment de restriction est donnée à la Figure 1, ainsi
30 que la séquence polypeptidique de la chimère correspondante (SAH-G-CSF, cf. Figure 2, panneau A).

Un fragment de restriction HindIII identique à l'exception du fragment MstII-ApaI peut également être facilement généré et qui code pour une protéine chimère

dans laquelle la forme B du G-CSF mature est positionnée par couplage génétique en phase traductionnelle en C-terminal de la molécule de SAH et d'un linker peptidique particulier. Par exemple ce linker est constitué de 4 résidus glycine dans le fragment HindIII du plasmide pYG1336 (chimère SAH-Gly4-G-CSF, cf. Figure 2, panneau A).

E.2.2. Fusion traductionnelle du type G-CSF-SAH.

Dans un mode réalisation particulier, les techniques combinées de mutagénèse dirigée et d'amplification PCR permettent de construire des gènes hybrides codant pour une protéine chimère (Figure 2, panneau B) résultant du couplage traductionnel entre un peptide signal (et par exemple la région prépro de la SAH), une séquence incluant un gène ayant une activité G-CSF, et la forme mature de la SAH ou un de ses variants moléculaires. Ces gènes hybrides sont préférentiellement bordés en 5' de l'ATG initiateur de traduction et en 3' du codon de fin de traduction par des sites de restriction HindIII. Par exemple l'oligodéoxynucléotide Sq2369 (5'-GTTCTACGCCACCTTGCGCAGCCCCGGTGGAGGCGGTGATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGG-3', les résidus soulignés (optionnels) correspondent dans cette chimère particulière à un linker peptidique composé de 4 résidus glycine) permet par mutagénèse dirigée de mettre en phase traductionnelle la forme mature du G-CSF humain du plasmide BBG13 immédiatement en amont de la forme mature de la SAH, ce qui génère le plasmide intermédiaire A. De façon similaire, l'utilisation de l'oligodéoxynucléotide Sq2338 [5'-CAGGGAGCTGGCAGGGCCCCAGGGGGTTTCGACGAAACACACCCCTGGAATAAGCCGAGCT-3' (brin non codant), les nucléotides complémentaires aux nucléotides codant pour les premiers résidus N-terminaux de la forme mature du G-CSF humain sont soulignés] permet par mutagénèse dirigée de coupler en phase traductionnelle de lecture la région prépro de la SAH immédiatement en amont de la forme mature du G-CSF humain, ce qui génère le plasmide intermédiaire B. On génère ensuite le fragment HindIII de la Figure 5 en associant le fragment HindIII-SstI du plasmide B (jonction région prépro de la SAH + fragment N-terminal du GCSF mature) avec le fragment SstI-HindIII du plasmide A [jonction G-CSF mature-(glycine)₄-SAH mature]. Le plasmide pYG1301 contient ce fragment de restriction HindIII particulier codant pour la chimère G-CSF-Gly4-SAH fusionnée immédiatement en aval de la région prépro de la SAH.

E.2.3. Fusion traductionnelle du type G-CSF-SAH-G-CSF.

Ces mêmes techniques de mutagénèse dirigée et d'amplification de l'ADN *in vitro* permettent de construire des gènes hybrides dans lesquelles une séquence codant pour une activité G-CSF est couplée aux extrémités N- et C- terminales de la SAH ou un de ses variants moléculaires (Figure 2, panneau C). Ces gènes hybrides sont préférentiellement bordés en 5' de l'ATG initiateur de traduction et en 3' du codon de fin de traduction par des sites de restriction HindIII.

EXEMPLE 3 : CONSTRUCTION DES PLASMIDES D'EXPRESSION

Les protéines chimères des exemples précédents peuvent être exprimées dans les levures à partir de promoteurs fonctionnels, régulables ou constitutifs, tels que, par exemple, ceux présents dans les plasmides pYG105 (promoteur LAC4 de Kluyveromyces lactis), pYG106 (promoteur PGK de Saccharomyces cerevisiae), pYG536 (promoteur PHO5 de S. cerevisiae), ou des promoteur hybrides tels que ceux portés par les plasmides décrits dans la demande de brevet EP 361 991.

Par exemple, le fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1259 est cloné dans l'orientation productive dans le site de restriction HindIII du plasmide d'expression pYG105, ce qui génère le plasmide d'expression pYG1266 (Figure 3). Le plasmide pYG105 correspond au plasmide pKan707 décrit dans la demande de brevet EP 361 991 dans lequel le site de restriction HindIII a été détruit par mutagénèse dirigée (oligodeoxynucleotide Sq1053: 5'-GAAATGCATAAGCTC-TTGCCATTCTCACCG-3') et dont le fragment SalI-SacI codant pour le gène URA3 a été remplacé par un fragment de restriction SalI-SacI comportant le promoteur LAC4 (sous la forme d'un fragment SalI-HindIII) et le terminateur du gène PGK de S. cerevisiae (sous la forme d'un fragment HindIII-SacI). Le plasmide pYG105 est mitotiquement très stable en l'absence de généticine (G418) et permet d'exprimer la protéine chimère à partir du promoteur LAC4 de K. lactis, notamment quand la source carbonnée est du lactose. Dans une autre exemplification, le clonage dans l'orientation productive du fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1259 dans le site HindIII du plasmide pYG106 génère le plasmide d'expression pYG1267. Les plasmides pYG1266 et pYG1267 sont isogéniques entre eux à l'exception du fragment de restriction SalI-HindIII codant pour le promoteur LAC4

de K. lactis (plasmide pYG1266) ou le promoteur PGK de S. cerevisiae (plasmide pYG1267).

Dans une autre exemplification, le clonage dans l'orientation productive du fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1336 (chimère SAH-Gly4-G.CSF, cf. E.2.1.) dans le site HindIII des plasmides pYG105 et pYG106 génère les plasmides d'expression pYG1351 et pYG1352, respectivement.

De même, le clonage dans l'orientation productive du fragment de restriction HindIII du plasmide pYG1301 (chimère G.CSF-Gly4-SAH, cf. E.2.2.) dans le site HindIII des plasmides pYG105 et pYG106 génère les plasmides d'expression pYG1302 et pYG1303, respectivement.

EXEMPLE 4 : TRANSFORMATION DES LEVURES

La transformation des levures appartenant au genre Kluyveromyces, et en particulier les souches MW98-8C et CBS 293.91 de K. lactis, s'effectue par exemple par la technique de traitement des cellules entières par de l'acétate de lithium (Ito H. et al., J. Bacteriol. 153 (1983) 163-168), adaptée comme suit. La croissance des cellules se fait à 28°C dans 50 ml de milieu YPD, avec agitation et jusqu'à une densité optique à 600 nm (DO_{600}) comprise entre 0,6 et 0,8 ; les cellules sont récoltées par centrifugation à faible vitesse, lavées dans une solution stérile de TE (10 mM Tris HCl pH 7,4 ; 1 mM EDTA), resuspendues dans 3-4 ml d'acétate lithium (0,1 M dans du TE) pour obtenir une densité cellulaire d'environ 2×10^8 cellules/ml, puis incubées à 30°C pendant 1 heure sous agitation modérée. Des aliquotes de 0,1 ml de la suspension résultante de cellules compétentes sont incubés à 30°C pendant 1 heure en présence d'ADN et à une concentration finale de 35 % de polyéthylène glycol (PEG₄₀₀₀, Sigma). Après un choc thermique de 5 minutes à 42°C, les cellules sont lavées 2 fois, resuspendues dans 0,2 ml d'eau stérile et incubées 16 heures à 28°C dans 2 ml de milieu YPD pour permettre l'expression phénotypique de la fusion ORF1-APH exprimée sous contrôle du promoteur P_{K1} ; 200 µl de la suspension cellulaire sont ensuite étalés sur boîtes YPD sélectives (G418, 200 µg/ml). Les boîtes sont mises à incuber à 28°C et les transformants apparaissent après 2 à 3 jours de croissance cellulaire.

EXEMPLE 5 : SECRETION DES CHIMERES

Après sélection sur milieu riche supplémenté en G418 les clones recombinants sont testés pour leur capacité à sécréter la forme mature des protéines chimères entre SAH et G-CSF. Quelques clones correspondant à la souche K. lactis

5 CBS 293.91 transformée par les plasmides pYG1266 ou pYG1267 (SAH-G.CSF), pYG1302 ou pYG1303 (G.CSF-Gly4-SAH) ou encore pYG1351 ou pYG1352 (SAH-Gly4-G.CSF) sont mis à incuber en milieu liquide complet sélectif à 28°C. Les surnageants cellulaires sont alors testés après électrophorèse en gel d'acrylamide à 8.5 %, soit directement par coloration du gel d'acrylamide par du bleu de

10 coomassie (Figure 4, panneau A), soit après immunoblot en utilisant comme anticorps primaires des anticorps polyclonaux de lapin spécifiquement dirigés contre le G-CSF humain, ou contre la SAH. Lors des expériences de détection immunologique, le filtre de nitrocellulose est d'abord incubé en présence de l'anticorps spécifique, lavé plusieurs fois, incubé en présence d'anticorps de chèvre

15 anti-lapin biotinylés, puis incubé en présence d'un complexe avidine-péroxydase en utilisant le "kit ABC" distribué par Vectastain (Biosys S.A., Compiègne, France). La réaction immunologique est ensuite révélée par addition de diamino-3,3' benzidine tetrachlorhydrate (Prolabo) en présence d'eau oxygénée, selon les recommandations du fournisseur. Les résultats de la Figure 4 démontrent que la protéine hybride SAH-

20 G.CSF est reconnue à la fois par des anticorps dirigés contre l'albumine humaine (panneau C) et le G-CSF humain (panneau B). Les résultats de la Figure 6 indiquent que la chimère SAH-Gly4-G.CSF (piste 3) est particulièrement bien sécrétée par la levure Kluyveromyces, possiblement du fait que la présence du linker peptidique entre partie SAH et partie G-CSF est plus favorable à un repliement indépendant de ces 2 parties lors du transit de la chimère dans la voie sécrétoire. De plus la fusion N-

25 terminale (G.CSF-Gly4-SAH) est également sécrétée par la levure Kluyveromyces (Figure 6, piste 1).

EXEMPLE 6 : PURIFICATION ET CARACTERISATION MOLECULAIRE DES PRODUITS SECRETES

30 Après centrifugation d'une culture de la souche CBS 293.91 transformée par les plasmides d'expression selon l'exemple 3, le surnageant de culture est passé à travers un filtre de 0,22 mm (Millipore), puis concentré par ultrafiltration (Amicon)

en utilisant une membrane dont le seuil de discrimination se situe à 30 kDa. Le concentrat obtenu est alors ajusté à 50 mM Tris HCl à partir d'une solution stock de Tris HCl 1M (pH 6), puis déposé par fractions de 20 ml sur une colonne (5 ml) échangeuse d'ions (Q Fast Flow, Pharmacia) équilibrée dans le même tampon. La protéine chimère est alors éluée de la colonne par un gradient (0 à 1 M) de NaCl. Les fractions contenant la protéine chimère sont alors réunies et dialysées contre une solution de Tris HCl 50 mM (pH 6) et redéposées sur colonne Q Fast Flow (1 ml) équilibrée dans le même tampon. Après élution de la colonne, les fractions contenant la protéine sont réunies, dialysées contre de l'eau et lyophilisées avant caractérisation: par exemple, le séquençage (Applied Biosystem) de la protéine SAH-G.CSF sécrétée par la levure CBS 293.91 donne la séquence N-terminale attendue de la SAH (Asp-Ala-His...), démontrant une maturation correcte de la chimère immédiatement en C-terminal du doublet de résidus Arg-Arg de la région "pro" de la SAH (Figure 1).

EXEMPLE 7 : ACTIVITE BIOLOGIQUE DES CHIMERES ENTRE SAH ET G-CSF

E.7.1. Activité biologique *in vitro*.

Les chimères purifiées selon l'exemple 6 sont testées pour leur capacité à permettre la prolifération *in vitro* de la lignée murine IL3-dépendante NFS60, par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée essentiellement selon le protocole décrit par Tsuchiya et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. (1986) 83 7633]. Pour chaque chimère, les mesures sont réalisées entre 3 et 6 fois dans un test trois points (trois dilutions du produit) dans une zone où la relation entre quantité de produit actif et incorporation de thymidine marquée (Amersham) est linéaire. Dans chaque plaque de microtitration, l'activité d'un produit référence constitué de G-CSF humain recombinant exprimé dans des cellules mammifères est également systématiquement incorporé. Les résultats de la Figure 7 démontrent que la chimère SAH-G.CSF (pYG1266) sécrétée par la levure *Kluyveromyces* est capable *in vitro* de transduire un signal de prolifération cellulaire pour la lignée NFS60. Dans ce cas particulier, l'activité spécifique (cpm/molarité) de la chimère est environ 7 fois plus faible que celle du G-CSF référence (non couplé).

E.7.2. Activité in vivo

L'activité de stimulation des chimères SAH/G-CSF sur la granulopoïèse in vivo est testée après injection sous-cutanée chez le rat (Sprague-Dawley/CD, 250-300 g, 8-9 semaines) et comparée à celle du G-CSF référence exprimé à partir de cellules de mammifère. Chaque produit, testé à raison de 7 animaux, est injecté par voie sous-cutanée en région dorso-scapulaire à raison de 100 µl pendant 7 jours consécutifs (J1-J7). 500 µl de sang sont recueillis aux jours J-6, J2 (avant la 2^{ème} injection), J5 (avant la 5^{ème} injection) et J8, et une numération sanguine est effectuée. Dans ce test, l'activité spécifique (unités de neutropoïèse/mole injectée) de la chimère SAH-G-CSF (pYG1266) est identique à celle du G-CSF référence (Figure 8). Puisque cette chimère particulière possède in vitro une activité spécifique 7 fois plus faible que celle du G-CSF référence (Figure 7), il est donc démontré que le couplage génétique du G-CSF sur la SAH en modifie favorablement les propriétés pharmacocinétiques.

REVENDICATIONS

1. Polypeptide recombinant comportant une partie active constituée par tout ou partie du G-CSF ou d'un variant du G-CSF couplé à une structure stabilisatrice essentiellement protéique.
- 5 2. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce que la partie active présente une structure choisie parmi :
 - (a) la séquence peptidique comprise entre les résidus Thr586-Pro759 de la séquence donnée sur la Figure 1,
 - (b) une partie de la structure peptidique (a) ayant conservé l'activité
10 biologique du G-CSF, et,
 - (c) une structure dérivée des structures (a) ou (b) par modifications structurales (mutation, substitution, addition et/ou délétion d'un ou plusieurs résidus), et ayant conservé l'activité biologique du G-CSF, ou une activité modifiée.
- 15 3. Polypeptide selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la partie active est couplée à l'extrémité N-terminale de la structure stabilisatrice.
4. Polypeptide selon la revendication 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que la partie active est couplée à l'extrémité C-terminale de la structure stabilisatrice.
5. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que la structure stabilisatrice est un polypeptide possédant une demie-vie plasmatique
20 élevée.
6. Polypeptide selon la revendication 5 caractérisé en ce que le polypeptide possédant une demie-vie plasmatique élevée est une protéine telle qu'une albumine, une apolipoprotéine, une immunoglobuline ou encore une transferrine.
- 25 7. Polypeptide selon la revendication 5 caractérisé en ce que le polypeptide possédant une demie-vie plasmatique élevée est dérivé par modification(s) structurale(s) (mutation, substitution, addition et/ou délétion d'un ou plusieurs résidus, modification chimique) d'une protéine selon la revendication 6.

8. Polypeptide selon l'une des revendications 5 à 7 caractérisé en ce que la structure stabilisatrice est un polypeptide faiblement ou non-immunogénique pour l'organisme dans lequel il est utilisé.

5 9. Polypeptide selon la revendication 5 caractérisé en ce que la structure stabilisatrice est une albumine ou un variant de l'albumine.

10. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

10 11. Séquence nucléotidique selon la revendication 10 caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence "leader" permettant la sécrétion du polypeptide exprimé.

12. Cassette d'expression comprenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 10 ou 11 sous le contrôle d'une région d'initiation de la transcription et éventuellement d'une région de terminaison de la transcription.

15 13. Plasmide autoréplcatif comportant une cassette d'expression selon la revendication 12.

14. Cellule recombinante eucaryote ou procaryote dans laquelle a été inséré une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 10 ou 11 ou une cassette d'expression selon la revendication 12 ou un plasmide selon la revendication 13.

20 15. Cellule recombinante selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure, d'une cellule animale, d'un champignon ou d'une bactérie.

16. Cellule recombinante selon la revendication 15 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure.

17. Cellule recombinante selon la revendication 16 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure du genre Saccharomyces ou Kluyveromyces.

25 18. Procédé de préparation d'un polypeptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que l'on cultive une cellule recombinante selon l'une des revendications 14 à 17 dans des conditions d'expression, et on récupère le polypeptide produit.

19. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

20. Composition pharmaceutique selon la revendication 19 destinée à être utilisée dans toutes les situations pathologiques dans lesquelles le nombre et/ou
5 l'activité des granulocytes doivent être stimulées.

21. Composition pharmaceutique selon la revendication 20 destinée à la prévention ou au traitement des leukopénies ou de certaines leucémies.

22. Composition pharmaceutique selon la revendication 20 utilisable dans le cas de greffes ou de traitement anticancéreux, pour restaurer le système immunitaire.

SEQ. ID NO: 1

TYPE DE SEQUENCE : Nucléotide et sa protéine correspondante
 LONGUEUR : 2382 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : 1
 CONFIGURATION : Linéaire
 TYPE DE MOLECULE : Fragment de restriction HindIII du plasmide d'expression pYG1259
 (chimère G.CSF-SAH)
 ORIGINE : Recombinaisons génétiques *in vitro*

AAGCT TTACAACAAA TATAAAAACA	ATG AAG TGG GTA ACC TTT ATT TCC CTT CTT TTT CTC TTT	-12
	Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe	
AGC TCG GCT TAT TCC AGG GGT GTG TTT CGT CGA GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT		9
Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His		
CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG		29
Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln		
TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT		49
Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe		
GCA AAA ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT		69
Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu		
TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC		89
Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp		
TGC TGT GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC		109
Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn		
CCA AAC CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC		129
Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp		
AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT		149
Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe		
TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC		169
Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys		
CAA GCT GCT GAT AAA GCT GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG		189
Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly		
AAG GCT TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAG TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA		209
Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg		
GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTA GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA		229
Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala		
GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT		249
Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp		
CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAA GAT		269
Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp		
TCG ATC TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC		289
Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys		
ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT TCA TTA GCT GCT GAT TTT		309
Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe		
GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG		329
Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met		
TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTA CTG CTG CTG AGA CTT		349
Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu		

Figure 1(a)

GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys	369
TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys	389
CAA AAT TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val	409
CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn	429
CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala	449
GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val	469
AGT GAC AGA GTC ACC AAA TGC TGC ACA GAA TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser	489
GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe	509
CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu	529
GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp	549
GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala	569
GAG GAG GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA GCT <u>GCC TTA GGC</u> TTA ACC CCC CTG <u>GGC</u> Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Thr Pro Leu Gly	589
<u>CCT</u> GCC AGC TCC CTG CCC CAG AGC TTC CTG CTC AAG TGC TTA GAG CAA GTG AGG AAG ATC Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile	609
CAG GGC GAT GGC GCA GCG CTC CAG GAG AAG CTG TGT GCC ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro	629
GAG GAG CTG GTG CTG CTC GGA CAC TCT CTG GGC ATC CCC TGG GCT CCC CTG <u>AGC TCC</u> TGC Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys	649
CCC AGC CAG GCC CTG CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAA CTC CAT AGC GGC CTT TTC CTC Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu	669
TAC CAG GGG CTC CTG CAG GCC CTG GAA GGG ATA TCC CCC GAG TTG GGT CCC ACC TTG GAC Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp	689
ACA CTG CAG CTG GAC GTC GCC GAC TTT GCC ACC ACC ATC TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu	709
GGA ATG GCC CCT GCC CTG CAG CCC ACC CAG GGT GCC ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe	729
CAG CGC CGG GCA GGA GGG GTC CTG GTT GCT AGC CAT CTG CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser	749
TAC CGC GTT CTA CGC CAC CTT GCG CAG CCC TGA AGCTT Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro ***	759

Figure 1(b)

3/10

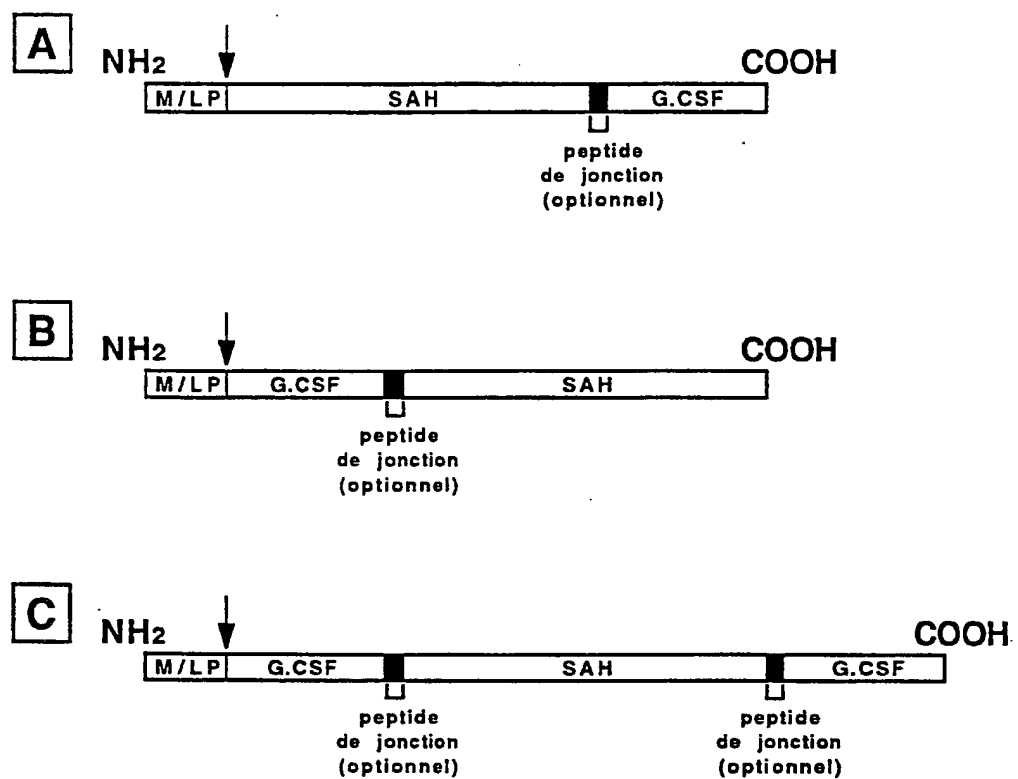


Figure 2

4/10

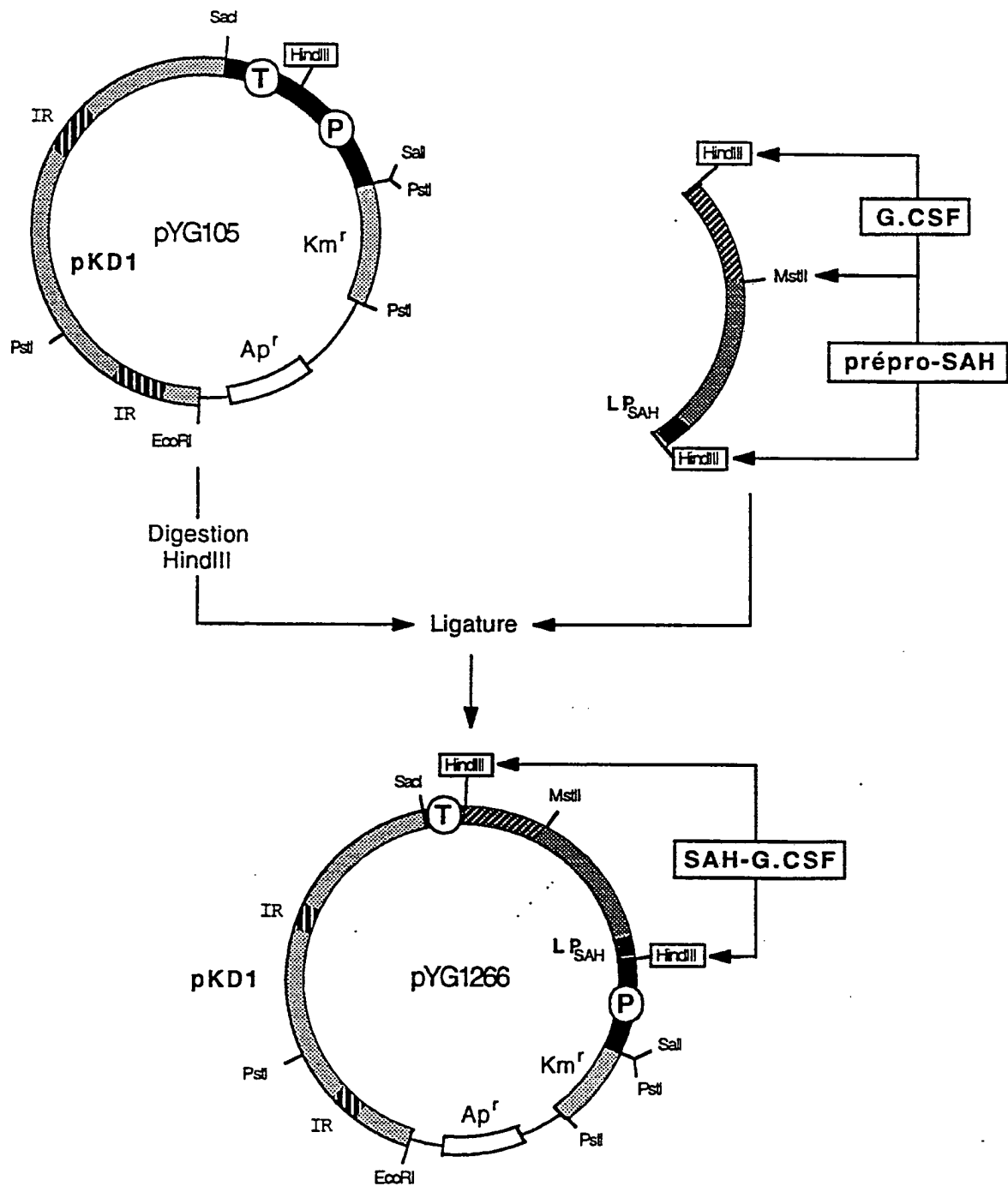


Figure 3

5/10

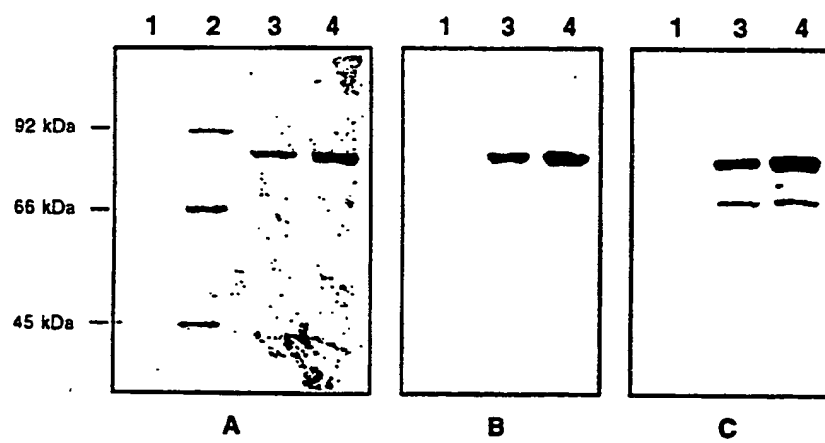


Figure 4

FEUILLE DE REMPLACEMENT

SEQ. ID NO.:

TYPE DE SEQUENCE : Nucléotide et sa protéine correspondante
 LONGUEUR : 2455 nucléotides
 NOMBRE DE BRINS : 1
 CONFIGURATION : Linéaire
 TYPE DE MOLECULE : Fragment de restriction HindIII du plasmide d'expression pYG1301
 (chimère G.CSF-Gly4-SAH positionnée immédiatement en aval de la région prépro de la SAH)
 ORIGINE : Recombinaisons génétiques *in vitro*

```

AAGCT TTACAACAAA TATAAAACA ATG AAG TGG GTA ACC TTT ATT TCC CTT CTT TTT CTC TTT
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe -12
                                     ApaI
AGC TCG GCT TAT TCC AGG GGT GTG TTT CGT CGA ACC CCC CTG GGC CCT GCC AGC TCC CTG
Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu 9
                                     I---->G-CSF
CCC CAG AGC TTC CTG CTC AAG TGC TTA GAG CAA GTG AGG AAG ATC CAG GGC GAT GGC GCA
Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala 29
GCG CTC CAG GAG AAG CTG TGT GCC ACC TAC AAG CTG TGC CAC CCC GAG GAG CTG GTG CTG
Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu 49
                                     SstI
CTC GGA CAC TCT CTG GGC ATC CCC TGG GCT CCC CTG AGC TCC TGC CCC AGC CAG GCC CTG
Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu 69
CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAA CTC CAT AGC GGC CTT TTC CTC TAC CAG GGG CTC CTG
Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu 89
CAG GCC CTG GAA GGG ATA TCC CCC GAG TTG GGT CCC ACC TTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC
Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp 109
GTC GCC GAC TTT GCC ACC ACC ATC TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG GGA ATG GCC CCT GCC
Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala 129
CTG CAG CCC ACC CAG GGT GCC ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG CGC CGG GCA GGA
Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly 149
GGG GTC CTG GTT GCT AGC CAT CTG CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG TAC CGC GTT CTA CGC
Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg 169
CAC CTT GCG CAG CCC GGT GGA GGC GGT GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT
His Leu Ala Gln Pro Gly Gly Gly Gly Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe 189
G-CSF<---I linker I--->SAH
AAA GAT TTG GGA GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT
Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu 209
CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT GCA AAA
Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys 229
ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA
Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly 249
GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT
Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys 269
GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC
Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn 289
CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC AAT GAA
Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu 309
GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC
Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala 329

```

Figure 5(a)

CCG	GAA	CTC	CTT	TTC	TTT	GCT	AAA	AGG	TAT	AAA	GCT	GCT	TTT	ACA	GAA	TGT	TGC	CAA	GCT
Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala
349																			
GCT	GAT	AAA	GCT	GCC	TGC	CTG	TTG	CCA	AAG	CTC	GAT	GAA	CTT	CGG	GAT	GAA	GGG	AAG	GCT
Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala
369																			
TCG	TCT	GCC	AAA	CAG	AGA	CTC	AAG	TGT	GCC	AGT	CTC	CAA	AAA	TTT	GGA	GAA	AGA	GCT	TTC
Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe
389																			
AAA	GCA	TGG	GCA	GTA	GCT	CGC	CTG	AGC	CAG	AGA	TTT	CCC	AAA	GCT	GAG	TTT	GCA	GAA	GTT
Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val
409																			
TCC	AAG	TTA	GTG	ACA	GAT	CTT	ACC	AAA	GTC	CAC	ACG	GAA	TGC	TGC	CAT	GGA	GAT	CTG	CTT
Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu
429																			
GAA	TGT	GCT	GAT	GAC	AGG	GCG	GAC	CTT	GCC	AAG	TAT	ATC	TGT	GAA	AAT	CAA	GAT	TCG	ATC
Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile
449																			
TCC	AGT	AAA	CTG	AAG	GAA	TGC	TGT	GAA	AAA	CCT	CTG	TTG	GAA	AAA	TCC	CAC	TGC	ATT	GCC
Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala
469																			
GAA	GTG	GAA	AAT	GAT	GAG	ATG	CCT	GCT	GAC	TTG	CCT	TCA	TTA	GCT	GCT	GAT	TTT	GTT	GAA
Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu
489																			
AGT	AAG	GAT	GTT	TGC	AAA	AAC	TAT	GCT	GAG	GCA	AAG	GAT	GTC	TTC	CTG	GGC	ATG	TTT	TTG
Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu
509																			
TAT	GAA	TAT	GCA	AGA	AGG	CAT	CCT	GAT	TAC	TCT	GTC	GTA	CTG	CTG	CTG	AGA	CTT	GCC	AAG
Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys
529																			
ACA	TAT	GAA	ACC	ACT	CTA	GAG	AAG	TGC	TGT	GCC	GCT	GCA	GAT	CCT	CAT	GAA	TGC	TAT	GCC
Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala
549																			
AAA	GTG	TTC	GAT	GAA	TTT	AAA	CCT	CTT	GTG	GAA	GAG	CCT	CAG	AAT	TTA	ATC	AAA	CAA	AAT
Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn
569																			
TGT	GAG	CTT	TTT	GAG	CAG	CTT	GGA	GAG	TAC	AAA	TTC	CAG	AAT	GCG	CTA	TTA	GTT	CGT	TAC
Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr
589																			
ACC	AAG	AAA	GTA	CCC	CAA	GTG	TCA	ACT	CCA	ACT	CTT	GTA	GAG	GTC	TCA	AGA	AAC	CTA	GGA
Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly
609																			
AAA	GTG	GGC	AGC	AAA	TGT	TGT	AAA	CAT	CCT	GAA	GCA	AAA	AGA	ATG	CCC	TGT	GCA	GAA	GAC
Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp
629																			
TAT	CTA	TCC	GTG	GTC	CTG	AAC	CAG	TTA	TGT	GTG	TTG	CAT	GAG	AAA	ACG	CCA	GTA	AGT	GAC
Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp
649																			
AGA	GTC	ACC	AAA	TGC	TGC	ACA	GAA	TCC	TTG	GTG	AAC	AGG	CGA	CCA	TGC	TTT	TCA	GCT	CTG
Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu
669																			
GAA	GTC	GAT	GAA	ACA	TAC	GTT	CCC	AAA	GAG	TTT	AAT	GCT	GAA	ACA	TTC	ACC	TTC	CAT	GCA
Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala
689																			
GAT	ATA	TGC	ACA	CTT	TCT	GAG	AAG	GAG	AGA	CAA	ATC	AAG	AAA	CAA	ACT	GCA	CTT	GTT	GAG
Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu
709																			
CTT	GTG	AAA	CAC	AAG	CCC	AAG	GCA	ACA	AAA	GAG	CAA	CTG	AAA	GCT	GTT	ATG	GAT	GAT	TTC
Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe
729																			
GCA	GCT	TTT	GTA	GAG	AAG	TGC	TGC	AAG	GCT	GAC	GAT	AAG	GAG	ACC	TGC	TTT	GCC	GAG	GAG
Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe	Ala	Glu	Glu
749																			
MstII																			
GGT	AAA	AAA	CTT	GTT	GCT	GCA	AGT	CAA	GCT	GCC	TTA	GCG	TTA	TAA	CATCACATTT				
Gly	Lys	Lys	Leu	Val	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	***					
763																			
AAAAGCATCT CAGCCTACCA TGAGAATAAG AGAAAGAAAA TGAAGATCAA AAGCTT																			

Figure 5(b)

8/10

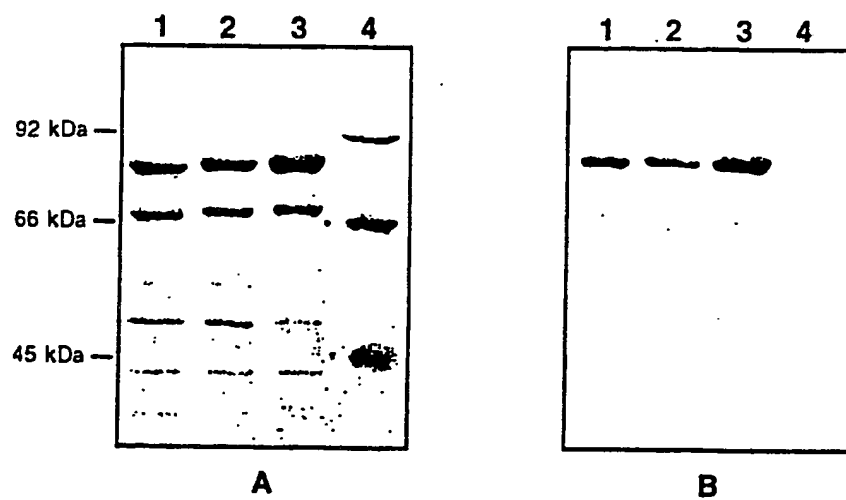


Figure 6

FEUILLE DE REMPLACEMENT

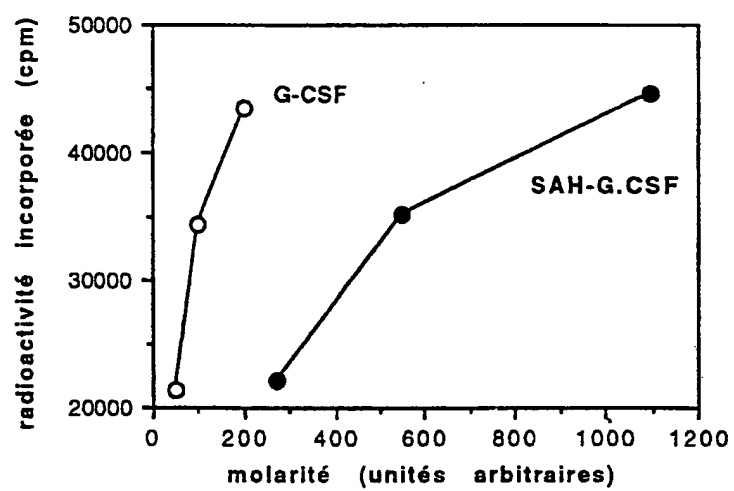


Figure 7

10/10

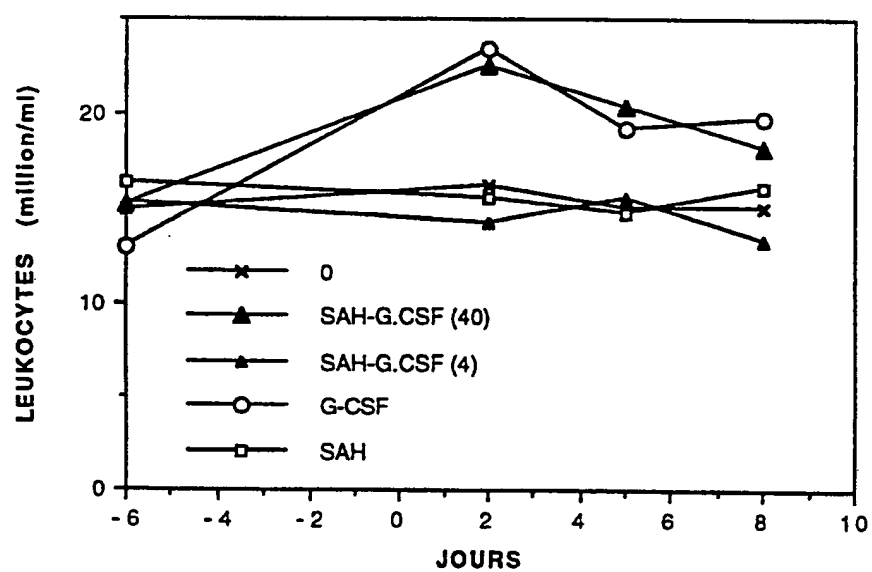


Figure 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR93/00086

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. ⁵ : C12N 15/62; C12N 1/19; A61K 37/02; C07K 13700 C12N 15/27; C12N 15/14; //(C12N 1/19, C12R 1/645) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl. ⁵ : C07K; C12N; A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE, A, 3 723 781 (CHUGAISEIYAKU K.K.) 21 January 1988, see page 4, line 68 - page 5, line 1; claims; tables	1,5-6,8-9
A	---	19-22
Y	EP, A, 0 364 980 (DENKI KAGAKU KOGYOKABUSHIKI KAISHA) 25 April 1990, see abstract see page 2, lines 28-30 see page 3, lines 1-6 see page 3, line 54	1,5-6,8-9
Y	EP, A, 0 395 918 (VASCULAR LABORATORY, INC.) 7 November 1990, see column 1, lines 24-48 see column 16, lines 26-40	1,5-6,8-9
Y	WO, A, 9 013 653 (DELTA BIOTECHNOLOGY LIMITED) 15 November 1990, see page 9, lines 18-24	1,5-6,8-9
A	EP, A, 0 361 991 (RHONE-POULENC SANTE) 4 April 1990, cited in the application ./.	10-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 June 1993 (17.06.93)		Date of mailing of the international search report 2 July 1993 (02.07.93)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR93/00086

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	see examples 1-4 --- EP, A, 0 401 384 (KIRIN-AMGEN, INC.) 12 December 1990, see page 1, line 15 - page 3 -----	1,19-22

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300086
SA 70240

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

17/06/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-A-3723781	21-01-88	AU-B- 611856	27-06-91
		AU-A- 7566587	21-01-88
		BE-A- 1000253	27-09-88
		CH-A- 671157	15-08-89
		FR-A- 2601591	22-01-88
		GB-A, B 2193631	17-02-88
		JP-A- 63146826	18-06-88
		NL-A- 8701640	16-02-88
		SE-A- 8702907	19-01-88
		JP-A- 63146827	18-06-88
		JP-A- 63152326	24-06-88
		JP-A- 63146828	18-06-88
EP-A-0364980	25-04-90	JP-A- 2111799	24-04-90
		DE-U- 6890599	19-05-93
		JP-A- 2275900	09-11-90
EP-A-0395918	07-11-90	AU-A- 5316290	18-10-90
		CA-A- 2014470	13-10-90
		CN-A- 1049865	13-03-91
		JP-A- 3117484	20-05-91
WO-A-9013653	15-11-90	AU-B- 630450	29-10-92
		AU-A- 5564690	29-11-90
		EP-A- 0470165	12-02-92
		GB-A, B 2246783	12-02-92
		JP-T- 4506598	19-11-92
EP-A-0361991	04-04-90	FR-A- 2635115	09-02-90
		FR-A- 2649991	25-01-91
		AU-B- 623425	14-05-92
		AU-A- 3933289	08-02-90
		JP-A- 2276589	13-11-90
EP-A-0401384	12-12-90	CA-A- 2006596	22-06-90
		WO-A- 9006952	28-06-90

EPO FORM P0079

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT/FR 93/00086

Demande Internationale No

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ?		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 C12N15/62; C12N15/27;	C12N1/19; C12N15/14;	A61K37/02; /(C12N1/19,C12R1/645)
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C07K ; C12N ; A61K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ^o	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
Y	DE,A,3 723 781 (CHUGAISEIYAKU K.K.) 21 Janvier 1988 voir page 4, ligne 68 - page 5, ligne 1; revendications; tableaux	1,5-6, 8-9
A	---	19-22
Y	EP,A,0 364 980 (DENKI KAGAKU KOGYOKABUSHIKI KAISHA) 25 Avril 1990 voir abrégé voir page 2, ligne 28 - ligne 30 voir page 3, ligne 1 - ligne 6 voir page 3, ligne 54	1,5-6, 8-9
Y	EP,A,0 395 918 (VASCULAR LABORATORY , INC.) 7 Novembre 1990 voir colonne 1, ligne 24 - ligne 48 voir colonne 16, ligne 26 - ligne 40 ---	1,5-6, 8-9
	---	-/--
^o Catégories spéciales de documents cités: ¹¹ ^{"A"} document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent ^{"E"} document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date ^{"I"} document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) ^{"O"} document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens ^{"P"} document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée ^{"T"} document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention ^{"X"} document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive ^{"Y"} document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier. ^{"Z"} document qui fait partie de la même famille de brevets		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
17 JUIN 1993		02-07-1993
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		Signature du fonctionnaire autorisé LE CORNEC N.D.R.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUEES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ¹⁵	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
Y	WO,A,9 013 653 (DELTA BIOTECHNOLOGY LIMITED) 15 Novembre 1990 voir page 9, ligne 18 - ligne 24 ---	1,5-6, 8-9
A	EP,A,0 361 991 (RHONE-POULENC SANTE) 4 Avril 1990 cité dans la demande voir exemples 1-4 ---	10-18
A	EP,A,0 401 384 (KIRIN-AMGEN, INC.) 12 Décembre 1990 voir page 1, ligne 15 - page 3 -----	1,19-22

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300086
SA 70240

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

17/06/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
DE-A-3723781	21-01-88	AU-B- 611856	27-06-91
		AU-A- 7566587	21-01-88
		BE-A- 1000253	27-09-88
		CH-A- 671157	15-08-89
		FR-A- 2601591	22-01-88
		GB-A, B 2193631	17-02-88
		JP-A- 63146826	18-06-88
		NL-A- 8701640	16-02-88
		SE-A- 8702907	19-01-88
		JP-A- 63146827	18-06-88
		JP-A- 63152326	24-06-88
		JP-A- 63146828	18-06-88
EP-A-0364980	25-04-90	JP-A- 2111799	24-04-90
		DE-U- 6890599	19-05-93
		JP-A- 2275900	09-11-90
EP-A-0395918	07-11-90	AU-A- 5316290	18-10-90
		CA-A- 2014470	13-10-90
		CN-A- 1049865	13-03-91
		JP-A- 3117484	20-05-91
WO-A-9013653	15-11-90	AU-B- 630450	29-10-92
		AU-A- 5564690	29-11-90
		EP-A- 0470165	12-02-92
		GB-A, B 2246783	12-02-92
		JP-T- 4506598	19-11-92
EP-A-0361991	04-04-90	FR-A- 2635115	09-02-90
		FR-A- 2649991	25-01-91
		AU-B- 623425	14-05-92
		AU-A- 3933289	08-02-90
		JP-A- 2276589	13-11-90
EP-A-0401384	12-12-90	CA-A- 2006596	22-06-90
		WO-A- 9006952	28-06-90

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.